利用Δ^{15}N值评估不同硝态氮浓度下的桑树幼苗无机氮供需关系

张富荣[1]，吴沿友[1, 2*]，张开艳[3]

（1. 江苏大学 农业工程学院 现代农业装备与技术教育部重点实验室，江苏 镇江 212013；2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室，贵阳 550081；3. 贵州师范大学 喀斯特研究院，贵阳 550001）

摘　要：喀斯特地区土壤中的硝态氮占主导地位，但土壤中的硝态氮含量存在时间和空间上的异质性。因此，种植在喀斯特地区的桑树幼苗可能会遭受低氮胁迫。为了给种植在喀斯特地区的桑树幼苗提供科学的无机氮管理，该研究以桑树幼苗为材料，采用水培试验，以改进的 Hoagland 营养液为培养基质，以δ^{15}N 值为 22.35‰的硝酸钠提供唯一氮源，设置三个硝态氮浓度梯度（0.5、2 和 8 mmol·L^{-1}），测定桑树幼苗的光合特征以及叶、茎和根的干重、碳含量、氮含量和δ^{15}N 值，分析不同供氮水平下桑树幼苗的生理响应，通过整个植株尺度的稳定氮同位素分馏值来评估桑树幼苗的氮需求与氮供应的关系，通过植株的氮积累量与碳积累量来研究碳氮耦合关系。结果表明：（1）当硝酸盐浓度在 0.5~2 mmol·L^{-1} 时，增加硝酸盐的浓度能显著提高桑树幼苗的叶绿素含量和净光合速率，进而显著促进生物量的积累。然而，当硝酸盐浓度超过 2 mmol·L^{-1} 时，更多的硝酸盐供应（8 mmol·L^{-1}）并没有带来叶绿素含量、净光合速率和生物量的显著增加。（2）增加硝酸盐的供应量能促进桑树幼苗的氮同化，桑树幼苗的氮积累量随着硝态氮供应量的增加而逐渐增加，然而，桑树幼苗的碳积累量在硝酸盐浓度为 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 时无明显变化。（3）桑树幼苗的硝态氮同化产物的稳定氮同位素分馏值在硝酸盐浓度为 2 mmol·L^{-1} 时达到最小。由此可知，硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时的无机氮供应量接近桑树幼苗的无机氮需求量，外部氮供应量与植株氮需求量接近平衡意味着植物体内的碳氮代谢能够有效协调，进而实现了碳氮同化产物的同步增长。

关键词：硝态氮，桑树，碳氮代谢，稳定氮同位素分馏，氮需求

中图分类号：Q945.1　　　　　**文献标识码：**A

Use of Δ^{15}N value to estimate the relationship between nitrogen supply and nitrogen demand for *Morus alba* seedlings under different nitrate concentrations

ZHANG Furong[1], WU Yanyou[1, 2*], ZHANG Kaiyan[3]

(1. *Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology*, *Ministry of Education*, *Institute of Agricultural Engineering*, *Jiangsu University*, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China; 2. *State Key Laboratory of Environmental Geochemistry*, *Institute of Geochemistry*, *Chinese Academy of Sciences*, Guiyang 550081, China; 3. *School of Karst Science*, *Guizhou Normal University,* Guiyang 550001, China)

基金项目：贵州省科学技术基金（黔科合基础［2020］1Y172）。

第一作者：张富荣(1998-)，硕士研究生，研究方向为植物的无机氮利用机制，（E-mail）furongzhang0218@126.com。

***通信作者：**吴沿友，博士，研究员，研究方向为喀斯特生态环境和环境地球化学，（E-mail）wuyanyou@mail.gyig.ac.cn。

Abstract: Nitrate is predominant in the karst soils. However, the temporal and spatial heterogeneity was observed for the nitrate content in the soils. Hence, the *Morus alba* seedlings grown in karst regions may suffer from low nitrogen stress. In order to provide a scientific management of inorganic nitrogen for *M. alba* seedlings grown in karst regions, the *M. alba* seedlings were used as the experimental materials in this study. The *M. alba* seedlings were grown hydroponically with a modified Hoagland solution. $NaNO_3$, with a $\delta^{15}N$ of 22.35‰, was employed as the sole nitrogen source at three concentrations (0.5, 2, and 8 $mmol \cdot L^{-1}$) in this study. The photosynthetic characteristics, dry weight, carbon content, nitrogen content and $\delta^{15}N$ values of the leaves, stems and roots of the *M. alba* seedlings were measured in this study. The physiological response to different nitrogen supply levels was analyzed for *M. alba* seedlings. The relationship between internal nitrogen demand and external nitrogen supply of *M. alba* seedlings was estimated based on the stable nitrogen isotope fractionation values at the whole-plant scale. The carbon-nitrogen coupling relationship was studied based on the nitrogen accumulation amount and carbon accumulation amount in the whole plant. The results were as follows：(1) When the nitrate concentrations ranged from 0.5 to 2 $mmol \cdot L^{-1}$, increasing nitrate concentrations significantly increased the chlorophyll content and net photosynthetic rate of the *M. alba* seedlings, which in turn significantly promoted the biomass accumulation. However, when the nitrate concentration exceeded 2 $mmol \cdot L^{-1}$, more nitrate supply (8 $mmol \cdot L^{-1}$) did not lead to a significant increase in the chlorophyll content, net photosynthetic rate and biomass. (2) Increasing the nitrate supply could promote the nitrogen assimilation in *M. alba* seedlings. The nitrogen accumulation amount in *M. alba* seedlings gradually increased with increasing nitrate supply. However, the carbon accumulation amount in *M. alba* seedlings did not change significantly at nitrate concentrations of 2 $mmol \cdot L^{-1}$ and 8 $mmol \cdot L^{-1}$; (3) The stable nitrogen isotope fractionation values of the nitrate assimilates in the whole *M. alba* seedlings reached the minimum value at 2 $mmol \cdot L^{-1}$ nitrate. Therefore, the inorganic nitrogen supply at the nitrate concentration of 2 $mmol \cdot L^{-1}$ is close to the internal nitrogen demand of *M. alba* seedlings, and the close balance between external nitrogen supply and internal nitrogen demand of the plants means an effective coordination of carbon and nitrogen metabolism in plants, thus achieving a simultaneous increase in carbon and nitrogen assimilates.

Key words: nitrate nitrogen, *Morus alba*, carbon and nitrogen metabolism, stable nitrogen isotope discrimination, nitrogen demand

植物吸收利用的无机氮主要是硝态氮和铵态氮。然而，在通气性良好或者 pH 为碱性的土壤中，大量铵根在好气性细菌的作用下通过硝化作用迅速转变为硝酸根。喀斯特地区的基岩中富含钙元素（Huang et al., 2015），钙质土壤具有高 pH 的特点（Wan et al., 2009），所以喀斯特地区土壤中铵态氮会以很高的速率氧化成硝态氮，这也加剧了喀斯特地区土壤低铵多硝的特征。由于喀斯特地区土壤中的硝态氮占主导地位，因此，探究喀斯特生境植物对硝态氮浓度的生理响应具有重要研究意义。

硝酸盐对植物的生长具有多重作用，生物圈中 99%的有机氮由植物同化的硝态氮转化而来（Wang et al., 1993）。硝态氮是一种重要的营养元素，同时在植物体内扮演着信号分子的作用，硝酸盐能够调节乙烯、脱落酸的合成，并与细胞分裂素相互作用调节植物的衰老（Wen et al., 2020）。植物进化出了高亲和转运系统和低亲和转运系统以便适应土壤中硝态氮浓度的异质性分布。前人研究表明土壤中硝态氮的积累量是决定氮肥肥效的主要因子，也是决定不同形态氮素效果的主要因子（苗艳芳，2014）。因此，探究偏碱性条件下不同浓度的硝态氮对植物生长发育的影响，对科学管理喀斯特环境中植物的无机氮供应具有重要意义。

植物光合碳同化与氮同化联系紧密，既相互依存又彼此竞争。光合碳同化是植物利用光反应过程中形成的 ATP 和 NADPH 把 CO_2 还原成糖类或其他有机物的过程；植物无机氮同化是指植物吸收环境里的 NO_3^-或 NH_4^+，利用光反应和暗反应产生的还原力和能量，同时利用碳同化产物作为氨基受体合成氨基酸的过程，植物体中氨基酸的合成将碳同化与氮同化密切联系在一起（Wang et al., 2014；Busch et al., 2018）。适量施氮会促进植物的氮代谢与碳代谢（张开艳等，2022），同时氮同化会消耗很大一部分光合产物和还原力。光合碳同化为氮同化提供能量与骨架，氮同化会与碳同化竞争光合作用产生的还原力以及中间产物（Geng et al., 2010）。因此，探究合理的氮素施用量对提高植物的产量与品质有重要研究价值。

植物根系从培养基质中吸收无机氮后，部分无机氮在根部同化，未同化的无机氮部分转运到叶部同化，部分返回到培养基质中（Hu et al., 2022）。植物在同化无机氮时总是偏爱更轻的氮（^{14}N），相应地，流出的未同化的无机氮就富集更重的无机氮（^{15}N）。因此，整个植株尺度的稳定氮同位素值就相对偏负于氮源的稳定氮同位素值（Hu & Guy, 2020）。整个植株尺度的稳定氮同位素值与氮源稳定氮同位素值的差值是由于氮同位素分馏造成的（Kalcsits & Guy, 2013）。在硝酸盐作为唯一氮源的条件下，整个植株尺度的稳定氮同位素分馏值将取决于硝酸还原酶的活力和还原力的供应情况。硝酸还原酶活力强，还原力供应充足，从根部流入的硝酸盐就会尽可能多地被同化，于是，从根部流出的未同化的硝酸盐的量就会减少。相应地，整个植株植株尺度的稳定氮同位素分馏值就会偏小。若植物遭受硝酸还原酶活力限制或还原力限制，那么根部流出的未同化的硝酸盐的量就会增加，这就会导致整个植株尺度的氮同位素分馏增大（Mariotti et al., 1982）。因此，整个植株尺度的稳定氮同位素分馏值就与植株的硝酸盐供需密切相关。基于同位素质量平衡方程（Hayes, 2004），可以计算出种植在不同硝酸盐浓度下的整个植株尺度的稳定氮同位素分馏值，这样就能在时间尺度上评估植物的硝酸盐供需情况，从而弥补了传统方法不能在时间尺度上评估植物的硝酸盐供需情况的不足。

桑树（*Morus alba*）为多年生落叶木本植物，在我国分布极为广泛，我国桑园面积居世界之首，提供了世界 80%的桑蚕茧生产量。桑树集较高生态价值与较高经济价值于一体，是多元开发、生态扶贫的极好树种。植桑养蚕产业的成本低、技术门槛低。我国西南部属于喀斯特地区，多山少地，基底脆弱，种桑养蚕效益远高于种植甘蔗、玉米、黄豆等农作物。桑树根系发达，具有涵养水源、防风固沙等功效（赵佩霞，2019），对于土体浅薄、成土速度缓慢、水土流失强烈的我国西南部喀斯特地区的修复和治理具有重要的价值。然而，若桑园氮素供应不足，桑树就会出现枝叶生长缓慢、枝条柔软细短、叶型小、叶质差和产量低等现象（袁颖，2018）。此外，适宜的硝态氮施用量还是桑树幼苗在逆境下维持高产优质的关键（逄好胜等，2014）。但是，桑树栽培在实际生产中仍处于粗放管理阶段，农民为提高产量盲目施用氮肥的状况普遍存在。过量施用氮肥不仅会导致严重的浪费，而且还会产生严重的环境问题。前期研究表明桑树是一种偏硝性的植物（许楠等，2012），因此，定量研究桑树幼苗在不同硝态氮浓度下的供需关系就能避免硝酸盐供应的不足和过量，从而科学管理桑树幼苗的硝酸盐供应。基于以上目的，本研究以桑树幼苗为研究对象，依托人工气候温室进行幼苗培育，采用溶液培养的方法，通过测定桑树幼苗在不同硝态氮浓度下的生长情况、碳氮含量与稳定氮同位素值，拟探讨以下问题：（1）不同硝态氮浓度下桑树幼苗的生理响应；（2）硝态氮供应与桑树幼苗无机氮需求的关系；（3）桑树幼苗在不同硝态氮浓度下的碳氮耦合关系。通过对以上问题的阐述，以期实现科学施用氮肥和为我国西南部喀斯特地区桑树栽培管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料培养和处理

实验在温室内进行，选取若干健康、饱满、大小一致的桑树种子（强桑 1 号，种子公司购买）浸种后播撒于 12 孔育苗穴盘中，在穴盘中放置清水以保持培养基质湿润，幼苗萌发后改用 1/8 霍格兰营养液培养，播种 60 d 后选取萌发且长势良好的 16 颗幼苗移栽到育苗盆中水培培养，培养液为 1/4 霍格兰营养液，23 d 后选取其中长势一致的 9 颗桑树幼苗采用改进的 1/2 霍格兰营养液进行培养，进行正式试验，每组三盆，共三组，改进的 1/2 霍格兰营养液成分为 1 mmol·L^{-1} $MgSO_4·7H_2O$、0.125 mmol·L^{-1} KH_2PO_4、2.5 mmol·L^{-1} KCl, 4 mmol·L^{-1} $CaCl_2$、0.1875 mmol·L^{-1} K_2SO_4、50 μmol·L^{-1} Fe(Na)EDTA、25 μmol·L^{-1} H_3BO_3、2 μmol·L^{-1} $MnSO_4·1H_2O$、2 μmol·L^{-1} $ZnSO_4·7H_2O$、0.1 μmol·L^{-1} $CuSO_4·5H_2O$、0.04 μmol·L^{-1} $CoCl_2·6H_2O$ 和 0.1 μmol·L^{-1} $Na_2MoO_4·2H_2O$。$\delta^{15}N$ 值为 22.35‰的硝酸钠提供唯一氮源。整个处理持续 20 d，处理期间每 2 d 更换一次处理液，每次每株桑树更换 500 mL 处理液以保持氮源环境相对恒定。

根据喀斯特地区土壤中硝态氮含量远小于 10 mmol·L^{-1}，且硝态氮存在异质性分布的实际情况，本实验设置 3 个硝态氮浓度梯度，分别为 0.5、2 和 8 mmol·L^{-1}，其中 0.5 mmol·L^{-1} 的硝态氮处理模拟喀斯特低氮水平，2 mmol·L^{-1} 的硝态氮处理模拟喀斯特中氮水平，8 mmol·L^{-1} 的硝态氮处理模拟喀斯特高氮水平。光照周期为 12 h，光照强度为（500 ± 25 ）μmol m^{-2}s^{-1}，光照时温度为（25 ± 2）℃，晚上的温度为（19 ± 2）℃，相对湿度为 55%~60 %，培养液的 pH 值为 7.5±0.1。

1.2 测定方法

1.2.1 植株生长参数测定

在实验处理开始前选取长势一致的 3 株桑树幼苗，分别测定其根、茎和叶的干重，取其根、茎和叶干重的平均值作为整个实验处理中桑树幼苗根、茎和叶的初始干重。相应地，这 3 株桑树幼苗根、茎和叶的碳氮含量的平均值近似为整个实验处理中桑树幼苗根、茎和叶的初始碳氮含量；这 3 株桑树幼苗根、茎和叶的稳定氮同位素值的平均值近似为整个实验处理中桑树幼苗根、茎和叶的初始稳定氮同位素值。

根据实验设计，在实验处理的最后一天将植株分为根、茎、叶三部分，分别用电子天平称量鲜重后，放置于鼓风干燥箱内 108 ℃下杀青 40 min，80 ℃烘干至恒重，称量干重。然后将根、茎、叶分别研磨成粉末，供后续测量碳氮含量和稳定氮同位素值。

1.2.2 叶绿素含量和光合参数测定

根据实验设计，在实验处理的最后一天，使用 SPAD-502Plus 叶绿素仪测定桑树幼苗由上至下第二片完全展开绿叶的 SPAD 值。采用便携式光合仪 Li-6800（LI-COR, Lincoln, NE, USA）测量净光合速率（P_n），气孔导度（G_s），蒸腾速率（T_r）和胞间 CO_2 浓度（C_i）。选用 6800-01A 荧光叶室，在测量过程中使用 CO_2 小钢瓶维持 CO_2 浓度为 400 μmol·mol^{-1}，控制气体流速为 500 mmol·s^{-1}，光合有效辐射为 500 μmol·m^{-2}·s^{-1}，叶温为 27 ℃。

1.2.3 光合氮利用效率

光合氮利用效率（photosynthetic nitrogen use efficiency，*PNUE*）是净光合速率与叶片氮含量的比值（Poorter & Evans，1998），通过以下公式计算：

$$PUNE = P_n / C_N \qquad (1)$$

式中：P_n 为叶片的净光合速率；C_N 是叶片的氮含量。

1.2.4 碳氮元素含量测定与碳氮积累量计算

使用元素分析仪（vario MACRO cube, Germany）测定桑树幼苗根、茎和叶的总碳含量和总氮含量，其总碳含量和总氮含量表示为叶片干重的质量百分比。

氮积累量(nitrogen accumulation amount, *NAA*)通过以下公式计算：

$$NAA = (DW_{leaf1} \times N_{leaf1} + DW_{stem1} \times N_{stem1} + DW_{root1} \times N_{root1}) - (DW_{leaf0} \times N_{leaf0} + DW_{stem0} \times N_{stem0} + DW_{root0} \times N_{root0})$$

（2）

式中：DW_{leaf1}、DW_{stem1} 和 DW_{root1} 分别为实验处理结束后的叶片、茎和根的干重；N_{leaf1}、N_{stem1} 和 N_{root1} 分别是通过元素分析仪测定的实验处理结束后的叶片、茎和根的氮含量；DW_{leaf0}、DW_{stem0} 和 DW_{root0} 分别为实验处理开始前的叶片、茎和根的干重；N_{leaf0}、N_{stem0} 和 N_{root0} 分别是通过元素分析仪测定的实验处理开始前的叶片、茎和根的氮含量。*NAA* 的标准误通过误差传递公式求得。

碳积累量（carbon accumulation amount, *CAA*）通过以下公式计算：

$$CAA=\left(DW_{leaf1}\times C_{leaf1}+DW_{stem1}\times C_{stem1}+DW_{root1}\times C_{root1}\right)-\left(DW_{leaf0}\times C_{leaf0}+DW_{stem0}\times C_{stem0}+DW_{root0}\times C_{root0}\right)$$

（3）

式中：C_{leaf1}、C_{stem1} 和 C_{root1} 分别是通过元素分析仪测定的实验处理结束后的叶片、茎和根的碳含量；C_{leaf0}、C_{stem0} 和 C_{root0} 分别是通过元素分析仪测定的实验处理开始前的叶片、茎和根的碳含量。*CAA* 的标准误通过误差传递公式求得。

1.2.5 稳定氮同位素测定

植物样品的稳定氮同位素值（$\delta^{15}N$）使用气体同位素质谱仪（MAT-253, Germany）测定。MAT-253 的测定精度为 0.2 ‰。测定稳定氮同位素时，用 IAEA N_1，IAEA N_2 和 IAEA NO_3 进行仪器校正。稳定氮同位素值通过以下公式计算：

$$\delta^{15}N(‰)=(R_{sample}/R_{standard}-1)\times 1000 \quad (4)$$

式中：R_{sample} 是桑树幼苗 $^{15}N/^{14}N$ 的同位素比值；$R_{standard}$ 为标准物质（大气中的 N_2）$^{15}N/^{14}N$ 的同位素比值。

测定桑树幼苗叶、茎和根的稳定氮同位素值后，桑树幼苗整个植株尺度的稳定氮同位素值（$\delta^{15}N_{whole\text{-}plant}$）即可通过以下公式计算（Robinson et al, 2000; Wang et al, 2016）：

$$\delta^{15}N_{whole\text{-}plant}(‰)=(m_{leaf}\times\delta^{15}N_{leaf}+m_{stem}\times\delta^{15}N_{stem}+m_{root}\times\delta^{15}N_{root})/(m_{leaf}+m_{stem}+m_{root}) \quad (5)$$

式中：m_{leaf}、m_{stem} 和 m_{root} 分别是桑树幼苗叶、茎和根的含氮总量（g），叶片含氮总量为叶片干重与叶片氮含量的乘积，茎部含氮总量为茎部干重与茎部氮含量的乘积，根部含氮总量为根部干重与根部氮含量的乘积；$\delta^{15}N_{leaf}$、$\delta^{15}N_{stem}$ 和 $\delta^{15}N_{root}$ 分别是桑树幼苗叶、茎和根的稳定氮同位素值。

计算出桑树幼苗实验处理前后的整个植株尺度的稳定氮同位素值后，基于同位素质量平衡方程（Hayes, 2004），即可计算出桑树幼苗在整个实验处理期的氮同化产物的稳定氮同位素值（$\delta^{15}N_{assimilates}$），氮同化产物的稳定氮同位素值通过以下公式计算：

$$\delta^{15}N_{assimilates}(‰)=(m_1\times\delta^{15}N_{whole\text{-}plant1}-m_0\times\delta^{15}N_{whole\text{-}plant0})/(m_1-m_0)$$
$$=(m_{l1}\times\delta^{15}N_{l1}+m_{s1}\times\delta^{15}N_{s1}+m_{r1}\times\delta^{15}N_{r1}-m_{l0}\times\delta^{15}N_{l0}-m_{s0}\times\delta^{15}N_{s0}-m_{r0}\times\delta^{15}N_{r0})/(m_1-m_0)$$

（6）

式中：$\delta^{15}N_{whole\text{-}plant1}$ 和 $\delta^{15}N_{whole\text{-}plant0}$ 分别是桑树幼苗实验处理后和实验处理前的整个植株尺度的稳定氮同位素值；m_1 和 m_0 分别是桑树幼苗实验处理后和实验处理前的整个植株的含氮总量，整个植株的含氮总量为叶片含氮总量、茎部含氮总量与根部含量总量的总和；$\delta^{15}N_{l1}$、$\delta^{15}N_{s1}$ 和 $\delta^{15}N_{r1}$ 分别是桑树幼苗实验处理后叶、茎和根的稳定氮同位素值；m_{l1}、m_{s1} 和 m_{r1} 分别是桑树幼苗实验处理后叶、茎和根的含氮总量；$\delta^{15}N_{l0}$、$\delta^{15}N_{s0}$ 和 $\delta^{15}N_{r0}$ 分别是桑树幼苗实验处理前叶、茎和根的稳定氮同位素值；m_{l0}、m_{s0} 和 m_{r0} 分别是桑树幼苗实验处理前叶、茎和根的含氮总量；$\delta^{15}N_{assimilates}$ 的标准误通过误差传递公式求得。

桑树幼苗硝态氮同化产物的稳定氮同位素分馏值（$\Delta^{15}N_{assimilates}$）通过以下公式计算（Evans et al., 1996）：

$$\Delta^{15}N_{assimilates}(‰) = \delta^{15}N_{substrate} - \Delta^{15}N_{assimilates} \quad (7)$$

式中：$\delta^{15}N_{substrate}$ 值为 22.35‰，$\Delta^{15}N_{assimilates}$ 的标准误通过误差传递公式求得。

1.2.6 数据处理与分析

所有测量的数据均用平均值±标准误（Mean±SE）表示，使用 DPS 统计软件对数据进行单因子显著性差异分析（Tukey's test, P<0.05）。文中的图用 Origin 软件绘制（2019b 版本）。

2 结果与分析

2.1 不同硝态氮浓度对桑树幼苗生长的影响

硝态氮的供应量对桑树幼苗的生长具有显著的影响（表 1）。增加硝态氮的供应量有助于改善桑树幼苗的生长情况。桑树幼苗在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时的植株干重显著高于 0.5 mmol·L^{-1} 时的植株干重。当硝态氮浓度达到 8 mmol·L^{-1} 时，桑树幼苗的植株干重也是显著高于 0.5 mmol·L^{-1} 时的植株干重，但与硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时相比无显著差异。这表明适当增加硝态氮的浓度对桑树幼苗的生长起到促进作用，但超过一定浓度后，增加硝态氮浓度带来的生长促进作用就不再显著。

表 1 不同硝态氮浓度对桑树幼苗生长的影响

Table 1 Effects of different nitrate concentrations on the growth of *Morus alba* seedlings

参数 Parameters	硝态氮浓度 Nitrate concentration (mmol·L^{-1})		
	0.5	2	8
叶干重 Dry weight of leaf (g)	0.68±0.04b	0.87±0.08ab	0.91±0.02a
茎干重 Dry weight of stem (g)	0.46±0.01a	0.56±0.04a	0.60±0.05a
根干重 Dry weight of root (g)	0.40±0.03a	0.48±0.02a	0.44±0.02a
干重 Dry weight (g·plant^{-1})	1.54±0.04b	1.91±0.12a	1.95±0.04a

注：表中数据为平均值±标准误，n=3，每行中不同字母表示具有显著性差异（Tukey's test, P＜0.05）。下同。

Note: Each value represents the mean±SE(n=3). Values signed with different letters in each line indicate significant differences by Tukey's test (P＜0.05). The same below.

2.2 不同硝态氮浓度对桑树幼苗光合作用参数和叶绿素含量的影响

光合作用对植物生长至关重要。由表 2 可知，桑树幼苗的净光合速率在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 时显著高于 0.5 mmol·L^{-1} 时的净光合速率，但是当硝态氮浓度升高为 8 mmol·L^{-1} 时的净光合速率相对于 2 mmol·L^{-1} 却轻微下降，这表明硝态氮的供应达到一定水平后，继续增加硝态氮的供应量对植物光合作用的促进作用有限；增加硝态氮的浓度有助于桑树叶绿素的生物合成，桑树幼苗在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 时的叶绿素含量均显著高于硝态氮浓度为 0.5 mmol·L^{-1} ，但是桑树幼苗的叶绿素含量在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 时无显著变化。

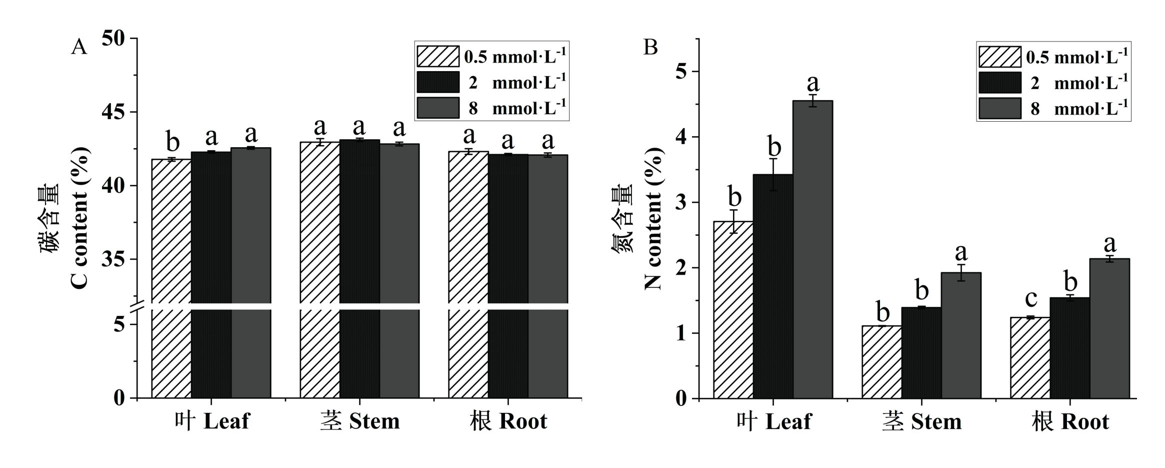
表 2 不同硝态氮浓度对桑树幼苗光合作用参数和叶绿素含量的影响

Table 2 Effects of different nitrate concentrations on the photosynthesis and chlorophyll content of *Morus alba* seedlings

参数 Parameters	硝态氮浓度 Nitrate concentration (mmol·L^{-1})		
	0.5	2	8
净光合速率 Net photosynthetic rate (μmol·m^{-2}·s^{-1})	10.14±0.35b	13.28±0.72a	13.00±0.68a
胞间 CO_2 浓度 Inter-cellular CO_2 concentration (μmol·mol^{-1})	287.73±9.15a	289.80±19.93a	252.91±3.64a
蒸腾速率 Transpiration rate (mmol·m^{-2}·s^{-1})	2.83±0.32a	3.92±0.84a	2.75±0.20a
气孔导度 Stomatal conductance (mol·m^{-2}·s^{-1})	0.17±0.02a	0.24±0.06a	0.16±0.01a
叶绿素含量 Chlorphyll content (SPAD)	48.70±0.99b	56.73±1.44a	58.33±0.67a

2.3 不同硝态氮浓度对桑树幼苗碳氮含量与碳氮积累量的影响

由图 1 可知，相较于碳含量，不同硝态氮浓度处理对桑树幼苗的氮含量产生了更显著的影响。在不同硝态氮浓度处理下，桑树幼苗除 0.5 mmol·L^{-1} 下叶片的碳含量显著低于 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 外，三个硝酸盐浓度下桑树幼苗的茎和根的碳含量均没有产生显著差异；但是施氮显著增加了桑树幼苗三个部分的氮含量，桑树幼苗三个部分的氮含量随着硝态氮浓度的升高而升高；整体来看，碳元素较为均匀的分布在桑树幼苗的三个部分中，而氮元素主要集中在桑树幼苗的叶部。



数值显示为平均值±标准误，n=3，柱状图标注不同字母表示具有显著差异性（Tukey's test, $P < 0.05$）。下同。

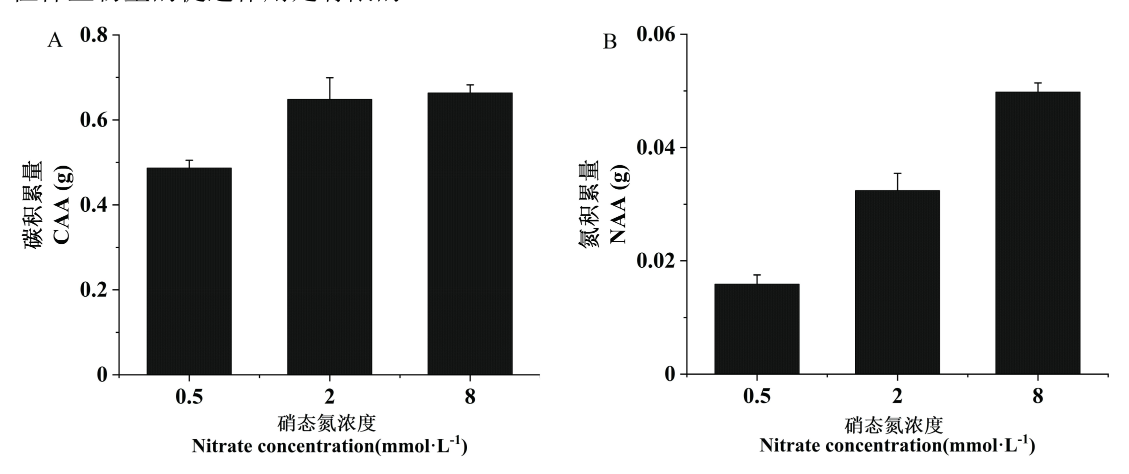
Each value represents the mean ± SE, (n=3), bar graphs labeled with different letters indicate significant differences (Tukey's test, $P < 0.05$). The same below.

图 1 不同硝态氮浓度对桑树幼苗叶部、茎部、根部碳含量（A）与氮含量（B）的影响

Fig. 1 Effects of different nitrate concentrations on the carbon contents (**A**) and nitrogen contents (**B**) of leaf, stem and root of *Morus alba* seedlings

实验处理期结束后桑树幼苗碳、氮积累量计算结果如图 2 所示，桑树幼苗的碳积累量随硝态氮浓度的升高呈现先升高后趋于稳定的现象。硝态氮浓度为 2 mmol· L^{-1} 时的碳积累量较 0.5 mmol·L^{-1} 时有明显的提升，但 2 mmol·L^{-1} 和 8 mmol·L^{-1} 硝态氮供应下的碳积累量无明显变化。桑树幼苗的氮积累量则随着硝态氮浓度的升高一直升高。说明在一定范围内增施氮

肥能够促进植株碳的同化，但是碳同化不会随着氮肥施用量的增加而持续增加，增施氮肥对植株生物量的促进作用是有限的。



标准误通过误差传递公式求得。

The error bars were calculated by the error propagation formula.

图 2 不同硝态氮浓度对桑树幼苗碳积累量（A）与氮积累量（B）的影响

Fig. 2 Effects of different nitrate concentrations on the carbon accumulation amount (**A**) and nitrogen accumulation amount (**B**) of *Morus alba* seedlings

2.4 不同硝态氮浓度对桑树幼苗光合氮利用效率的影响

由图 3 可知，桑树幼苗在硝态氮浓度为 0.5 mmol·L^{-1} 和 2 mmol·L^{-1} 时获得了较大的光合氮利用效率，过量的硝态氮供应（8 mmol·L^{-1}）反而降低了桑树幼苗的光合氮利用效率。这表明在一定范围内增加无机氮的施用量不会降低桑树幼苗的光合氮利用效率，但过量施用无机氮会造成无机氮的浪费。

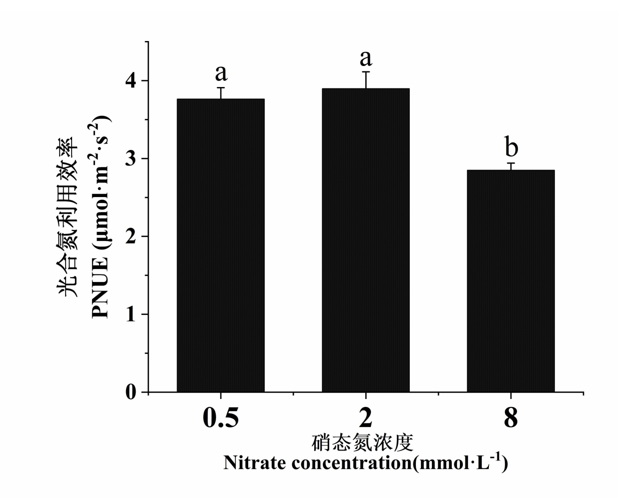


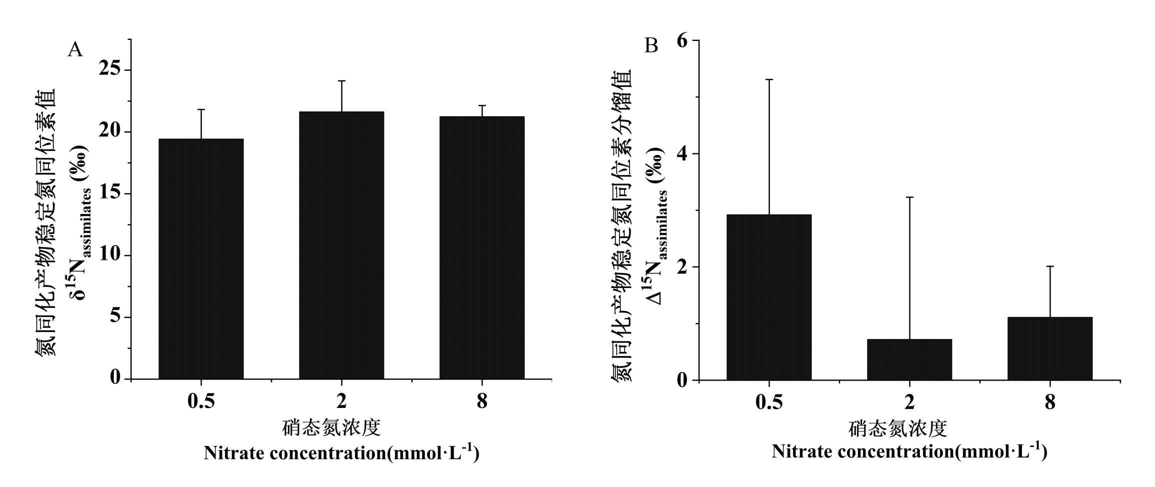
图 3 不同硝态氮浓度对桑树幼苗光合氮利用效率的影响

Fig. 3 Effects of different nitrate concentrations on the photosynthetic nitrogen use efficiency of *Morus alba* seedlings

2.5 不同硝态氮浓度对桑树幼苗植株氮同化产物δ^{15}N 值与Δ^{15}N 值的影响

由图 4 ：A 可知，不同硝态氮浓度处理下的桑树幼苗氮同化产物的稳定氮同位素值均小于氮源（硝酸钠）的稳定氮同位素值，这表明桑树幼苗在同化硝态氮时均发生了稳定氮同位素分馏。桑树幼苗植株氮同化产物的δ^{15}N 值呈现先增大后减小的趋势，在 2 mmol·L^{-1} 硝态氮浓度时达到最大，而在 8 mmol·L^{-1} 硝态氮浓度时出现降低；相应地，桑树幼苗植株氮同

化产物的$\Delta^{15}N$值则呈现先减小再增大的趋势，在2 mmol·L^{-1}硝态氮浓度时的植株$\Delta^{15}N$值最小，当硝态氮浓度增加到8 mmol·L^{-1}时，氮同位素分馏值增大。



标准误通过误差传递公式求得。

The error bars were calculated by the error propagation formula.

图4 不同硝态氮浓度对桑树幼苗植株氮同化产物$\delta^{15}N$值（A）与$\Delta^{15}N$值（B）的影响

Fig. 4 Effects of different nitrate concentrations on the $\delta^{15}N$ (A) and $\Delta^{15}N$ (B) values of the N assimilates in the whole *Morus alba* seedlings

3 讨论与结论

氮素运筹是调控作物生长发育、改善光合特性、提高产量的一项重要措施，研究表明作物生长及其产量与其氮素的供给关系密切（Cui & Lee, 2002）。适当增加氮肥可明显促进桑树生长（许楠等，2012）。硝态氮是植物吸收利用的最主要的无机氮，前期研究表明，桑树是一种偏硝性的植物（许楠等，2012）。因此，本实验研究了硝态氮浓度对桑树幼苗生长的影响。结果表明，适当增加硝态氮的浓度对桑树幼苗的生长起到显著的促进作用，这可能归功于2 mmol·L^{-1}的无机氮供应显著促进了叶绿素的生物合成，进而显著提高了桑树幼苗的净光合速率。然而，更多的硝酸盐供应（8 mmol·L^{-1}）并没有导致桑树幼苗的线性增长，这可能是因为此时的硝态氮供应已经超过了桑树幼苗的无机氮需求。本研究结果表明，桑树幼苗在硝态氮浓度为2 mmol·L^{-1}和8 mmol·L^{-1}时的叶绿素含量和净光合速率均无显著差异，这表明增施硝酸盐导致的光合促进作用存在饱和浓度。此外，更多的硝酸盐供应意味着增强的氮同化，这就会导致光合产物的大量消耗（Geng et al., 2010），进而不利于生物量的积累。

通常，高等植物的氮含量约占干重的1.5%~5%（Novoa & Loomis, 1981），且增加植物的无机氮供给有利于提高植物的氮含量（Gulmon & Chu, 1981）。在本实验中，我们发现增加硝态氮的浓度确实显著提高了桑树叶、茎和根的氮含量。相应地，桑树幼苗的氮积累量也就随之增加。然而，桑树幼苗虽然在硝态氮浓度为8 mmol·L^{-1}时获得最大氮积累量，但是相较于硝态氮浓度为2 mmol·L^{-1}时，硝态氮供应浓度提高了4倍，氮积累量仅提高了1.54倍；而硝态氮浓度从0.5 mmol·L^{-1}增加到2 mmol·L^{-1}时，硝态氮供应浓度同样提高了4倍，氮积累量却提高了2倍。这表明桑树幼苗在硝态氮浓度为2 mmol·L^{-1}时有相对更强的氮获取能力。硝酸还原酶作为一种诱导酶，虽然增加硝态氮的供应量能提高硝酸还原酶的活力从而促进桑树幼苗对NO_3^-的吸收和同化（Kaiser & Huber, 2001; Black et al., 2002）。但是，植物同化NO_3^-是一个主动耗能过程（Tsay et al., 1993），过程中植物会利用本身相当一部分的碳源和能量储备（Huppe & Turpin, 1994）。通常，植物每同化一分子硝酸盐需要消耗20分子ATP（Salsac et al., 1987），氮积累量越多意味着消耗的能量就越多。本研究中的净光合速率数

据显示，净光合速率在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 与 8 mmol·L^{-1} 时并无显著差异，相较于 2 mmol·L^{-1}，8 mmol·L^{-1} 的硝态氮供应对桑树幼苗的光合作用不再继续产生促进作用。光合作用为植物提供生长所需的物质和能量（Walters et al., 1993），而硝酸盐的同化则依赖光合作用产生的能量和还原力（Larsson et al., 1985）。因此，桑树幼苗在 8 mmol·L^{-1} 的硝态氮浓度下的最大氮积累量意味着大量的能量的消耗，这就导致了桑树幼苗在 8 mmol·L^{-1} 硝态氮浓度下的碳积累量较 2 mmol·L^{-1} 几乎没有增加。然而，当硝态氮浓度在 0.5 ~2 mmol·L^{-1} 时，增加硝态氮的供应量能实现桑树幼苗碳积累量和氮积累量的同步增加。桑树幼苗的碳积累量在 2 mmol·L^{-1} 硝态氮浓度下的显著增加应该是光合作用增强的结果，本研究结果显示桑树幼苗在 2 mmol·L^{-1} 硝态氮浓度下的净光合速率显著高于 0.5 mmol·L^{-1} 时的净光合速率。总的来说，合适的无机氮供应量有助于增强植物的碳氮代谢，而过量的无机氮供应仅有助于增强植物氮代谢，对碳代谢的促进作用不大。因此，通过大量施用氮肥来增产并不科学。

随着硝酸盐供应量的增加，叶片中硝酸还原酶的活力会不断增强（Kaiser & Huber, 2001; Black et al., 2002），所以桑树幼苗的氮积累量在不断增多。通常，高硝酸还原酶活性对应高的同化产物$\delta^{15}N$ 值（Pate et al., 1993），然而，桑树幼苗的硝态氮同化产物的$\delta^{15}N$ 值并没有随着硝态氮浓度的增加而线性增大。桑树幼苗的硝态氮同化产物的$\delta^{15}N$ 值在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时达到最大，而在 8 mmol·L^{-1} 时出现降低，这表明氮同化产物的$\delta^{15}N$ 值不仅与硝酸还原酶活力有关。桑树幼苗的硝态氮同化产物的$\delta^{15}N$ 值在硝态氮浓度为 8mmol·L^{-1} 时出现降低可能与还原力供应不足有关（Mariotti et al., 1982），因为硝态氮浓度从 2 mmol·L^{-1} 增加到 8 mmol·L^{-1} 时，光合氮利用效率降低了 26.40%，这间接表明还原力的供应受到了限制。基于桑树幼苗氮同化产物的的$\delta^{15}N$ 值，通过方程（7），即可计算出桑树幼苗在不同硝态氮浓度下整个植株同化硝态氮发生的稳定氮同位素分馏值（$\Delta^{15}N$ 值）。稳定氮同位素分馏值能指示外界氮供应与植物氮需求之间的关系（Pritchard & Guy, 2005；Kalcsits et al., 2014），通常，氮同位素分馏值越小，则外界的氮供应量越接近植物的氮需求量（即无机氮的供需平衡），而氮同位素分馏值越大，则表明外界的氮供应量低于或超过了植物的氮需求量。本研究结果表明，桑树幼苗的在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时的$\Delta^{15}N$ 值达到最小，且 8 mmol·L^{-1} 时的$\Delta^{15}N$ 值明显大于 2 mmol·L^{-1} 时的$\Delta^{15}N$ 值。由此可知，8 mmol·L^{-1} 的硝态氮供应明显超过了桑树幼苗的无机氮需求，在 0.5 mmol·L^{-1}、2 mmol·L^{-1}、8 mmol·L^{-1} 三个硝态氮水平中，硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时桑树幼苗的无机氮供需明显最优，即供需接近平衡。

综上所述，基于稳定氮同位素技术，植株在不同硝态氮浓度下的氮同化产物的稳定氮同位素分馏值能够被量化，进而可以通过稳定氮同位素分馏值的大小来判断植物的无机氮供需是否平衡。确保植物的无机氮供需平衡能够避免氮肥的浪费和不足。桑树幼苗在硝态氮浓度为 2 mmol·L^{-1} 时供需接近平衡，这就意味着此时的植物体内的碳氮代谢能够有效协调，进而实现了碳氮同化产物的同步增长。

参考文献：

BLACK BL, FUCHIGAMI LH, COLEMAN GD, 2002. Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar[J]. Tree Physiol, 22(10): 717-724.

BUSCH FA, SAGE RF, FARQUHAR GD, 2018. Plants increase CO_2 uptake by assimilating nitrogen via the photorespiratory pathway[J]. Nat Plants, 4(1): 46-54.

CUI RX, LEE BW, 2002. Spikelet number estimation model using nitrogen nutrition status and biomass at panicle initiation and heading stage of rice[J]. Korean J Crop Sci, 47(5): 390-394.

EVANS RD, BLOOM AJ, SUKRAPANNA SS, et al., 1996. Nitrogen isotope composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5) grown under ammonium or nitrate nutrition[J]. Plant Cell Environ, 19(11): 1317-1323.

GENG LI, GAO HY, LIU P, et al., 2010. Effects of nitrogen fertilization on photosynthetic performance in maize leaf at grain filling stage[J]. Plant Nutr Fert Sci, 16(3): 536-542.

GULMON SL, CHU CC, 1981. The effects of light and nitrogen on photosynthesis, leaf characteristics, and dry matter allocation in the chaparral shrub, *Diplacus aurantiacus*[J]. Oecologia, 49(2): 207–212.

HAYES JM, 2004. An introduction to isotopic calculations[J]. Woods Hole Oceanographic Institution: Woods Hole, MA, 2543.

HUANG F, ZHANG CL, XIE YC, et al., 2015. Inorganic carbon flux and its source in the karst catchment of Maocun, Guilin, China[J]. Environ Earth Sci, 74(2): 1079-1089.

HUPPE HC, TURPIN DH, 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells[J]. Annu Rev Biol, 45(1): 577-607.

HU Y, GUY RD, SOOLANAYAKANAHALLY RY, 2022. Nitrogen isotope discrimination in open-pollinated and hybrid canola suggests indirect selection for enhanced ammonium utilization[J]. Front Plant Sci, 13:1024080.

HU Y, GUY RD, 2020. Isotopic composition and concentration of total nitrogen and nitrate in xylem sap under near steady-state hydroponics[J]. Plant Cell Environ, 43(9): 2112-2123.

KAISER WM, HUBER SC, 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers[J]. J Exp Bot, 52(363): 1981-1989.

KALCSITS LA, GUY RD, 2013. Whole-plant and organ-level nitrogen isotope discrimination indicates modification of partitioning of assimilation, fluxes and allocation of nitrogen in knockout lines of Arabidopsis thaliana[J]. Physiol Plantarum, 149(2): 249-259.

KALCSITS LA, BUSCHHAUS HA, GUY RD, 2014. Nitrogen isotope discrimination as an integrated measure of nitrogen fluxes, assimilation and allocation in plants[J]. Physiol Plant, 151(3): 293–304.

LARSSON M, OLSSON T, LARSSON CM, 1985. Distribution of reducing power between photosynthetic carbon and nitrogen assimilation in *Scenedesmus*[J]. Planta, 164(2): 246-253.

MARIOTTI A, MARIOTTI F, CHAMPIGNY ML, et al., 1982. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO_3^- by pearl millet[J]. Plant Physiol, 69(4): 880-884.

MIAO YF, LI SX, XU XF, et al., 2014. Responses of winter wheat to ammonium and nitrate nitrogen[J]. Acta Pedologica Sinica, 51(3): 564-574. [苗艳芳， 李生秀， 徐晓峰， 等， 2014. 冬小麦对铵态氮和硝态氮的响应[J]. 土壤学报，51(3): 564-574.]

NOVOA R, LOOMIS RS, 1981. Nitrogen and plant production[J]. Plant Soil, 58(1–3): 177–204.

PATE JS, STEWART GR, UNKOVICH M, 1993. ^{15}N natural abundance of plant and soil components of a Banksia woodland ecosystem in relation to nitrate utilization, life form, mycorrhizal status and N_2-fixing abilities of component species[J]. Plant Cell Environ, 16(4): 365-373.

PANG HS, ZHANG HH, TIAN Y, et al., 2014. Effects of NO_3^--N on growth and photosynthetic characteristics of mulberry seedlings under Na_2CO_3 stress[J]. Pratacultural Science, 31(8):1515-1522. [逄好胜，张会慧，田野，等，2014. 硝态氮对 Na_2CO_3 胁迫下桑树幼苗生长和光合特性的影响[J].草业科学, 31(8):1515-1522.]

POORTER H, EVANS JR, 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area[J]. Oecologia, 116(1): 26-37.

PRITCHARD ES, GUY RD, 2005. Nitrogen isotope discrimination in white spruce fed with low concentrations of ammonium and nitrate[J]. Trees, 19(1): 89-98.

ROBINSON D, HANDLEY LL, SCRIMGEOUR CM, et al., 2000. Using stable isotope natural abundances ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) to integrate the stress responses of wild barley (Hordeum spontaneum C. Koch.) genotypes[J]. J Exp Bot, 51(342): 41-50.

SALSAC L, CHAILLOU S, MOROT GJF, et al., 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants[J]. Plant Physiol Biochem. 25(6): 805-812.

TSAY YF, SCHROEDER JI, FELDMANN K A, et al., 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter[J]. Cell, 72(5): 705-713.

WALTERS MB, KRUGER EL, REICH PB, 1993. Relative growth rate in relation to physiological and morphological traits for northern hardwood tree seedlings: species, light environment and ontogenetic considerations[J]. Oecologia, 96(2): 219-231.

WAN YJ, JU XT, INGWERSEN J, et al., 2009. Gross nitrogen transformations and related nitrous oxide emissions in an intensively used calcareous soil[J]. Soil Sci Soc Am J, 73(1): 102-112.

WANG M, SHEN QR, XU GH, et al., 2014. New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells[J]. Int Rev Cel Mol Bio, 310: 1-37.

WANG H, HU GQ, LOU YH, et al., 2016. Responses of natural ^{15}N abundance in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and soil to the application of organic and chemical fertilizers[J]. Can j Plant Sci, 96(5): 819-827.

WANG MY, SIDDIQI MY, RUTH TJ, et al., 1993. Ammonium Uptake by Rice Roots (II. Kinetics of $^{13}NH_4^+$ Influx across the Plasmalemma)[J]. Plant Physiol, 103(4): 1259-1267.

WEN BB, XIAO W, MU Q, et al., 2020. How does nitrate regulate plant senescence?[J]. Plant Physiol Biochem, 157: 60-69.

XU N, ZHANG HH, ZHU WX, et al., 2012. Effects of nitrogen form on seedling growth and its photosynthetic characteristics of forage mulberry[J]. Pratacultural Science, 29(10): 1574-1580. [许楠， 张会慧， 朱文旭， 等， 2012. 氮素形态对饲料桑树幼苗生长和光合特性的影响[J]. 草业科学，29(10): 1574-1580.]

YUAN Y, 2018. The role of nitrogen, phosphorus and potassium in mulberry production[J]. Newsletter of Sericulture and Tea, (1): 13-15. [袁颖， 2018. 氮、磷、钾在桑树生产中的作用[J]. 蚕桑茶叶通讯，(1): 13-15.]

ZHANG KY, WU YY, LI HT, et al, 2022. Effect of inorganic nitrogen supply on the salt-tolerance of *Brassica napus* plantlets *in vitro*[J]. Guihaia, 42(3):422-428.[张开艳, 吴沿友，李海涛, 等，2022. 无机氮供应对甘蓝型油菜组培苗盐耐受能力的影响[J]. 广西植物，42(3)：422-428.]

ZHAO PX, 2019. Chinese mulberry culture with a long history[J]. Rural · Agriculture · Farmers(Version A), (9): 55-58. [赵佩霞，2019. 源远流长的中华桑文化[J]. 农村 •农业 •农民（A 版），(9): 55-58.]